

稗草磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)基因的克隆与分析

张桂芳^{1,3} 赵明^{2,*} 丁在松² 张丽¹ 肖俊涛^{1*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³ 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘要: 为揭示 C_4 野生植物稗草 (*Echinochloa crusgalli*) PEPCase 的结构和功能特点, 探索改善作物高光效新途径, 克隆了稗草 (*E. crusgalli*) 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 (*ppc*) 的 cDNA 全长, 测序及同源性比较分析结果证实, 稗草 *ppc* 的 cDNA 全长为 2 886 bp, 编码 961 个氨基酸 (GenBank 登录号: AY251482); 核苷酸序列与谷子 (*Setaria italica*) C_3 型、高粱 (*Sorghum bicolor*) C_{3-2} 型、玉米 (*Zea mays*) C_{3-2} 型、水稻 (*Oryza sativa*) C_3 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的同源性分别达 94.8%、93.2%、93.0% 和 89.7%。推导的氨基酸序列中 C 末端第 771 位氨基酸是丙氨酸 (A), 表明是一个 C_3 型基因。与其他植物几种不同形式 PEPCase 进行的多重序列比对与系统进化分析结果也证实, 此基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与所有参与对比的 C_3 型序列的同源性均远远高于与 C_4 型的同源性。与玉米、高粱 C_{3-2} 型 PEPCase 的同源性分别高达 96.5%、96.4%, 与高粱、玉米的 C_{3-1} 型 PEPCase 的同源性分别为 84.3%、83.8%, 而与谷子、玉米、甘蔗和高粱的 C_4 型 PEPCase 的一致性相对较低, 分别为 82.2%、79.1%、77.1% 和 76.6%。因此进一步推论新克隆的稗草 *ppc* 基因属于 C_{3-2} 型。对其编码的蛋白序列进行了结构域、活性位点和功能位点预测。

关键词: 稗草; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 基因克隆与分析
中图分类号: S451

Cloning and Characterization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene from *Echinochloa crusgalli*

ZHANG Gui-Fang^{1,3}, ZHAO Ming^{2,*}, DING Zai-Song², ZHANG Li¹, XIAO Jun-Tao¹

(¹ College of Agronomy and Bio-technology of China Agricultural University, Beijing 100094; ² Institute of Crop Sciences, CAAS, Beijing 100081; ³ College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) has a variety of functions in plants. In order to elucidate structural and functional characters of PEPCase from *Echinochloa crusgalli*, and search a new approach to improve crops photosynthesis, a full-length cDNA for PEPCase was isolated from *E. crusgalli*. Using the program of Blast on NCBI GenBank database, the sequence presented a very high match with the genes from other plants. After alignment on ClustalW program, the identities of the cloned fragment with PEPCase genes from *Setaria italica* C_3 -form, *Sorghum vulgare* C_4 -form, *Zea mays* C_4 -form and *Oryza sativa* C_3 -form were about 94.8%, 93.2%, 93.0% and 89.7%, respectively. *E. crusgalli* *ppc* ORF is 2 886 bp, encoding 961 amino acid residues. The sequence has been submitted to the GenBank database, the accession number is AY251482. Alignment and phylogenetic analysis of the amino acid sequence deduced from the fragment and the PEPCase sequences of other plants retrieved from GenBank were carried out by ClustalW program, which showed that the sequences homology of *E. crusgalli* with C_3 -form was higher than with C_4 -form. To identify amino acid residues and/or domains responsible for C_4 / C_3 -specific properties, we found the putative amino acid sequence contains a C_3 conserved alanine at position 771, and the sequence shared a homology of 96.5%, 96.4% with the C_{3-2} -form PEPCase of *Zea mays* and *Sorghum vulgare*, 83.8%, 84.3% with the C_{3-1} -form PEPCase of *Zea mays* and *Sorghum vulgare*, and 82.2%, 79.1%, 77.1%, 76.6% with the C_4 -form PEPCase of *S. italica*, *Z. mays*, *S. spontaneum* and *Sorghum vulgare*. In conclusion, the cloned sequence is a C_{3-2} -form of PEPCase gene from *E. crusgalli*. The domain, active sites and function sites of *Echinochloa crusgalli* PEPC protein are predicted.

Key words: *Echinochloa crusgalli*; Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase); Gene cloning and characterization

基金项目: 国家重点基础研究和发展规划(973)项目: 作物高效抗旱的分子生物学及遗传学基础(2003CB114300); 作物抗旱的遗传学基础(2003CB114301)。国家研究与开发专项(863): 优质、抗逆转基因新品种(系)的选育与转基因技术创新研究(JY03-B-11)。

作者简介: 张桂芳, 女, 博士, 作物生理专业。* 通讯作者: 赵明, 男, 博士, 作物栽培专业。Tel: 010-68918752。

Received(收稿日期): 2004-10-20, Accepted(接受日期): 2005-01-18。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 的主要作用是参与 C_4 代谢途径的 CO_2 固定作用。其主要分布在 C_4 植物的叶肉细胞的叶绿体内, 形成 CO_2 的浓缩机制为维管束鞘细胞的 C_3 途径提供 CO_2 。近些年来利用生物技术已将编码该酶的基因 (*ppc*) 转移到 C_3 作物中并得到了超量表达^[1,2], 因此, PEPCase 成为改善 C_3 作物光合作用重点关注的酶。对多种植物的 *ppc* 序列和结构已进行了详尽解析^[3-8], 为转 C_4 基因作物的改造研究奠定了重要基础。

野生植物稗草 (*Echinochloa crusgalli*) 是一种典型的 C_4 光合类型植物, 它的地上、地下部分生长优势远超过水稻, 既能很好地适应水中环境, 又能适应极度干旱、高温条件, 与旱作的 C_4 作物玉米、高粱和谷子相比, 具有光合速率高、PEPCase 含量高等特点^[9]。因此它是开展转 PEPCase 基因重要供体资源。到目前为止, 对稗草资源的开发利用及光合功能基因的克隆研究在国际上仍属空白, 本研究首次对稗草的 C_4 光合途径关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因进行克隆, 并提交了 GenBank 数据库 (登录号: AY251482), 同时利用基因数据库资料对克隆的序列进行比较和分析。

1 材料和方法

1.1 植物材料

稗草 (*Echinochloa crusgalli*) 种植于中国农业大学科学园田间。

1.2 稗草总 RNA 的制备及 cDNA 合成

取光照 4 h 后的稗草绿叶, 基本参照 Trizol (Gibco 公司) 说明书方法提取总 RNA。cDNA 合成反应参照试剂盒 ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega 公司) 程序。

1.3 PCR 引物的设计与 PCR 合成

根据已报道甘蔗的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 cDNA 全长序列, 设计 1 对引物, 序列为 P1: 5'-ACT TCT AGA ATG CCG TCC GAG CAC C-3', P2: 5'-GTA GGT ACC CTA GCC GGT GTT CTG CA-3'。

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所用的 Taq 酶为 Takara LA Taq, 反应程序采用两步法进行, 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 70℃ 复性 30 s, 70℃ 延伸 3 min, 30 个循环, 然后 70℃ 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物的克隆

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查后, 切下目标带, 用 PCR 产物纯化试剂盒 (北京博大泰克公司产品) 回收 DNA, 回收的 PCR 产物与 pUCm-T

vector (上海 Sangon 公司) 连接。

1.5 测序及序列分析

含目的基因的克隆送交上海 Sangon 公司测定。测序结果采用 Blast 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源性搜索, DNA 序列及氨基酸序列的比较采用 DNASTar 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 稗草磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 cDNA 的 RT-PCR 合成反应

以稗草总 RNA 为模板, oligo (dT)₁₅ 为引物反转录合成总 cDNA。以 cDNA 为模板再进行 PCR 扩增, 结果有 3 个条带, 分别约 1 000 bp、1 600 bp 和 3 000 bp (图 1, 泳道 1), 其中最长的 3 000 bp 与已知的 PEPCase 基因的 cDNA 全长接近, 回收 3 000 bp 的目标片段与测序载体连接后测序。

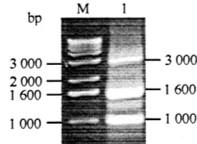


图 1 稗草 *ppc* cDNA 的 RT-PCR 产物电泳分析
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR products of *Echinochloa crusgalli ppc* cDNA

2.2 序列测定及测序结果的同源性检索、比较

经序列测定, PCR 合成片段长度为 2 906 bp, 包括一个 2 886 bp 长的开放阅读框。将核苷酸测序结果在 NCBI 服务器上用 Blast 搜索软件进行同源性基因检索, 结果显示, 与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中其他植物的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因序列有极高的同源性, 筛选部分 C_3 、 C_4 植物的该基因的不同亚型核苷酸序列运用 ClustalW 软件进行的多重比对分析, 发现同源性较高的依次是谷子 (*Setaria italica*) C_3 型 (AY491400)、高粱 (*Sorghum vulgare*) 根型 (X55664)、玉米 (*Zea mays*) 根型 (AB012228) 和水稻 (*Oryza sativa*) C_3 型 (AF271995), 同源率分别达 94.8%、93.2%、93.0% 和 89.7%。证明克隆的片段为稗草的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 cDNA 全长。

2.3 编码氨基酸序列同源性及类型分析

筛选几种典型 C_3 、 C_4 植物的不同形式的 PEPCase 编码序列运用 ClustalW 软件进行蛋白质序列的多重比对分析, 结果表明, 与玉米、高粱的根型、谷子的 C_3 型和水稻的 PEPCase 具有极高的同源性,

分别达到 96.5%、96.4%、96.4%、94.3% 的一致性,而与谷子、玉米、甘蔗和高粱的 C_4 型 PEPCase 的一致性相对较低,分别为 82.2%、79.1%、77.1%、76.6%。

由于 C_4 型 PEPCase 的 C 末端对应于第 774 位或左右附近的一个氨基酸残基都为丝氨酸,而所有 C_3 型 PEPCase 的相应位置均为丙氨酸^[14]。本研究克隆的稗草 PEPCase 在 C 末端第 771 位氨基酸是丙

氨酸(A)(图 2),表明是一个 C_3 型基因。同源性序列比较的结果也证实,此基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列与所有参与对比的 C_3 型序列的同源性均高于与 C_4 型比对的结果。并且在 C_3 型序列比较中发现,新克隆的稗草 *ppc* 基因序列更接近于 $C_{3,2}$ 型,确定在绿色叶片中能够同时表达不同形式的 PEPCase。

| | | 771 | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|-----------|-----------|---|---|---------|--------|----------|----------|----------|------|-----|-----|
| <i>E. crusgalli</i> : | 753 | KR RPSGGI | ESLRAIPWI | F | A | WTQTRFH | PPVWVG | FGAA | FKHI | MQ KDIRE | THT | L | 803 |
| <i>Z. mays C_{3,2}</i> : | 752 | KR KPSGGI | ESLRAIPWI | F | A | WTQTRFH | LPVWVG | FGAAIKHI | MQ KDIRE | I | HI | L | 802 |
| <i>S. vulgare C_{3,2}</i> : | 752 | KR KPSGGI | ESLRAIPWI | F | A | WTQTRFH | LPVWVG | FGAA | IKHI | MQ KDIRE | I | HVL | 802 |
| <i>O. sativa C₃</i> : | 751 | KR KPSGGI | ESLRAIPWI | F | A | WTQTRFH | LPVWVG | FGGA | FKHI | MQ KDIRE | I | HTL | 801 |
| <i>Z. mays C₃</i> : | 758 | KR KPSGGI | DSLRAIPWI | F | A | WTQTRFH | LPVWVG | FGAA | FKNVLQ | KDIRE | LHML | | 808 |
| <i>Z. mays C₄</i> : | 762 | KR RPSGGI | TTLRAIPWI | F | S | WTQTRFH | LPVWVG | VGAAFKFA | I | D KDIRE | FQV | L | 812 |
| <i>S. vulgare C₄</i> : | 753 | KR RPSGGI | TTLRAIPWI | F | S | WTQTRFH | LPVWVG | VGA | FKWAI | D KDIRE | FQK | L | 803 |

图 2 部分 C_3 、 C_4 植物 PEPCase 蛋白氨基酸的部分序列比较

Fig. 2 Partial sequence alignment of amino acid of PEPCase proteins from some C_3 , C_4 plants

2.4 编码蛋白质的功能位点与结构功能域确定

稗草的 PEPCase 基因编码 961 个氨基酸,通过 NCBI blast 分析,发现在 8~961 bp 之间为一个典型的大 *ppc* 结构域(图 3)。根据 PROSITE 数据库分析,其氨基酸序列含有两个大的 PEPC 活性位点,分别位于 165~176 氨基酸位点(PS00781, VITAHPTQs-vRR)和 588~600 氨基酸位点(PS00393, VMIGYSDS-gKDAG)(图 3)。另外还含有 9 种模式的其他功能位点,分别为蛋白激酶 C 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site, PS00005)、酪蛋白激酶 II 磷酸化

位点(Casein kinase II phosphorylation site, PS00006)、酪氨酸硫酸盐位点(tyrosine sulfation site, PS00003)、N-端十四烷酰化位点(N-myristoylation site, PS00008)、细胞辅助序列位点(cell attachment sequence, PS00016)、N-端糖基化位点(N-glycosylation site, PS00001)、酰胺化位点(amidation site, PS00009)、依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, PS00004)和酪氨酸激酶磷酸化位点(tyrosine kinase phosphorylation site, PS00007)。

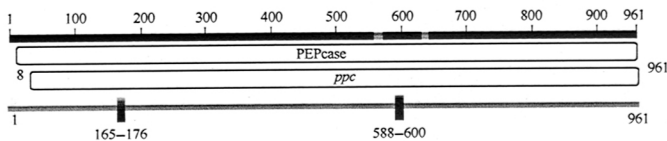


图 3 稗草 PEPCase 蛋白结构域(8~961)和氨基酸序列中的两个活性位点(165~176, 588~600)

Fig. 3 The domain (8~961) and two enzyme active sites (165~176, 588~600) of PEPCase protein in *Echinochloa crusgalli*

2.5 PEPCase 蛋白氨基酸序列的系统进化分析

应用 DNASTar 软件对 14 个蛋白序列做系统进化分析,进一步显示出不同类型的 PEPCase 同源性很小,3 个高粱 *ppc* 基因分属 C_4 型、 $C_{3,1}$ 型及 $C_{3,2}$ 型 3 个基因亚族,所推演的蛋白质的氨基酸序列在进化树中的遗传距离相差很远(图 4)。同样,玉米的 3 个基因亚族所翻译的蛋白的氨基酸同源性相差较远。而来源于不同种属的同一类型的 PEPCase 具有较高的同源性,从 PEPCase 进化树分析看,稗草和谷子 C_3

型最先聚类合并,在进化上显示靠得最近,接着与玉米、高粱 $C_{3,2}$ 型聚合,然后与水稻 C_3 型聚合;与稗草 PEPCase 进化关系较远的是甘蔗、高粱、玉米、谷子的 C_4 型以及高粱、玉米的 C_3 型 PEPCase;遗传距离最远的物种是与双子叶植物大豆、马铃薯和 *F. trinervia* 的 C_3 型。由此可以看出,在 PEPCase 的大家族中 C_4 型与非 C_4 型在进化过程中存在很大差异,同种类型的 PEPCase 在不同科属间的进化也存在差异。

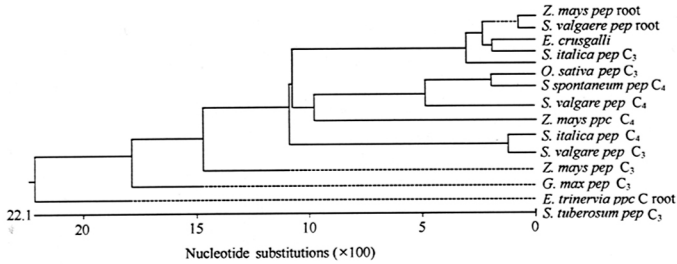


图4 部分C₃、C₄植物PEPCase蛋白进化树分析
Fig.4 Phylogenetic tree of PEPCase proteins from some C₃, C₄ plants

3 讨论

改善作物光合作用是提高作物产量的重要途径之一^[10]。如何改善作物的光合作用有着不同的途径,利用高光效的野生资源和C₄光合酶对C₃作物的遗传转化是两个重要途径^[11]。已将玉米PEPCase基因转入到水稻中并得到了超量表达^[1,2],而后又有超量表达高粱C₄型PEPCase基因的转基因水稻的报道^[12]。

植物的PEPCase基因由2~5个不同亚型组成,各自编码不同的PEPCase同工酶^[13]。主要包括C₄型和C₃型,C₃型又分为C_{3,1}型和C_{3,2}型,一般来说,在C₄型主要在C₄植物的绿色叶片中大量表达,而C_{3,1}型主要在黄化叶和茎等组织中表达;C_{3,2}型在根中大量表达;此外在豆科植物的根瘤中还有C_{3,3}型的表达;在CAM植物的绿色叶片中表达CAM型。这些不同类型的同工酶在高等植物体内维持碳代谢方面起着重要的调节作用。而非光合型PEPCase,即C_{3,1}型、C_{3,2}型和C_{3,3}型参与碳骨架回补作用,即补充三羧酸循环中由于氨基酸合成损失的碳骨架,保持pH和渗透平衡、重新固定呼吸所释放的CO₂、参与种子形成与萌发、果实成熟等。此外,该酶在气孔开闭和豆科植物根瘤固氮过程中也有特殊的作用^[14]。因此认为非光合型PEPCase在光合作用调节上也起着重要作用。

对玉米、甘蔗、小麦、水稻等数种C₃和C₄禾本科植物的 ppc cDNA序列进行的序列同源性比较结果证明, ppc 基因的5'和3'端均比较保守。因此,本文仅依据甘蔗 ppc 基因完整的编码区两端设计的1对引物扩增出了稗草 ppc 基因编码区的全长。而且,利用此对引物已经扩增了谷子 ppc 基因C_{3,2}型cDNA编码区全长(登录号:AY491400)^[15]。核苷酸

序列比较研究结果发现,这两个基因的同源性最高,达到94.8%,氨基酸序列系统进化分析研究结果也表明,新克隆的稗草PEPCase与谷子C_{3,2}型PEPCase在进化树中最先聚类合并,遗传距离最接近,接着与玉米、高粱C_{3,2}型聚合,然后与水稻C₃型聚合;而与甘蔗、高粱、玉米、谷子的C₄型以及高粱、玉米的C₃型PEPCase遗传距离较远。此结果表明, ppc 基因在进化过程中既具有强的保守性,又存在不同种属间的差异性。因此,通过对 ppc 基因中不同亚型基因的克隆和比较分析为进一步阐明 ppc 基因的进化、表达及其功能具有非常重要的意义。

C₄型和C₃型的PEPCase重要区别之一是对应的氨基酸编码序列中的第774位的氨基酸残基的种类,残基为丝氨酸(S)的为C₄型,而残基为丙氨酸(A)的则为C₃型^[16]。本研究从绿色叶片中所克隆的稗草 ppc 经同源性和序列特征分析均表明属于C_{3,2}型。推测稗草PEPCase的组织器官表达可能与其他C₄作物相比较有其特殊之处,也可能C₃、C₄型PEPCase存在于稗草同一器官中协同表达维持了叶片的高光效。

近来在 *Hydrilla verticillata*^[17,18] 和 *Bienertia cycloptera* (*Chenopodiaceae*)^[19] 中证实C₄循环和C₃循环能够在单细胞内完成,表明植物的光合代谢存在多种类型。也有一些研究初步发现,逆境条件(如盐害^[20]、干旱^[21-23]、低温^[24,25]及营养胁迫^[26]等)会改变不同类型光合酶在不同作物或不同器官的表达模式。因此推断PEPCase除了与光合作用直接相关外,还可能在抗逆生理上发挥作用。PEPCase的功能多效性可能与PEPCase的多类型有关。由于C₄型PEPCase在C₄光合作用中起到的重要作用,现在大量的研究主要集中在C₄型PEPCase上,但C_{3,1}、C_{3,2}和C_{3,3}等非光合型同工酶在植物体内所起的调节

功能不容忽视。因此,认为提高和改善 C_4 和 C_3 各型的协同性表达对提高作物光合和增加抗逆性是十分必要的。

References

- [1] Ku M S B, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotech.* 1999, 17: 76-80
- [2] Ku M S B, Cho D, Ranade U, Hsu T-P, Li X, Jiao D-M, Ehleringer J, Miyao M, Matsuoka M. Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C_4 photosynthesis enzymes. In: Sheehy J E, Mitchell P L, Hardy B, eds. Redesigning of Rice Photosynthesis to Increase Yield. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2000. 193-204
- [3] Crétin C, Keryer E, Tagu D, Lepiniec L, Vidal J, Gandal P. Complete cDNA sequence of sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C_4 photosynthesis. *Nucl Acids Res.* 1990, 18: 658
- [4] Crétin C, Santi S, Keryer E, Lepiniec L, Tagu D, Vidal J, Gandal P. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in sorghum: promoter structure, amino acid sequences and expression of genes. *Gene.* 1991, 99: 87-94
- [5] Cushman J C, Bohnert H J. Nucleotide sequence of the gene encoding a CAM specific isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17: 6 745-6 746
- [6] Dong L Y, Masuda T, Kawamura T, Hata S, Izui K. Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C_4 -form enzyme. *Plant Cell Physiol.* 1998, 39: 865-873
- [7] Izui K, Ishijima S, Yamaguchi Y, Katagiri F, Murata T, Shigesada K, Sugiyama T, Katsuki H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C_4 -pathway from maize. *Nucl Acids Res.* 1986, 14: 1 615-1 628
- [8] Merklebach S, Gehlen J, Denecke M, Hirsch H J, Kreuzaler F. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C_3 plant *Solanum tuberosum*. *Plant Mol Biol.* 1993, 23: 881-888
- [9] Zhang L (张丽). Comparison of photosynthetic characters and their physiological mechanism in C_3 and C_4 crops. Dissertation of Master degree in China Agricultural University (中国农业大学硕士学位论文), 2004
- [10] Kuang T-Y (匡廷云), Zhao M (赵明), Lu C-M (卢从明), Bai K-Z (白克智). Increasing efficiency of light using, raising output of crops. 21 century crop science and technology and development production colloquium corpus(21 世纪作物科技与生产发展学术讨论会文集), 2002. 20-26(in Chinese)
- [11] Zhao M (赵明), Zhao X-Q (赵秀琴), Zhang X (张旭), Erik Sacks, Renee Lafitte, Glenn D Dimayuga, Xiao J-T (肖俊涛). Characteristic of photosynthesis form rice distant hybridization progenies and screening high photosynthesis plants. 21 century crop science and technology and development production colloquium corpus(21 世纪作物科技与生产发展学术讨论会文集), 2002. 69-75
- [12] Zhang F (张方), Chi W (迟伟), Jin C-Z (金成哲), Wang Q (王强), Zhang Q-D (张其德), Wu N-H (吴乃虎). Molecular cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from sorghum involved in C_4 photosynthesis and breeding transgenic rice. *Chinese Science Bulletin (科学通报)*, 2003, 48(14): 1 542-1 546
- [13] Toh H, Kawamura T, Izui K. Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Physiol.* 1994, 17: 31-43
- [14] Litzko E, Kelly G J. The many-faced function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_3 plants. *Physiologie Vegetale.* 1983, 21: 805-815
- [15] Ding Z-S (丁在松). Cloning of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene from millet (*Setaria italica*) and sugarcane (*Sacharum officinarum*) and improvement of photosynthetic efficiency in their transgenic rice. PhD Dissertation, Chinese Academy of Sciences, 2004
- [16] Svensson P, Bläsing O E, Westhoff P. Evolution of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Archives of Biochem Biophy.* 2003, 414: 180-188
- [17] Rao S K, Magnin N C, Reiskind J B, Bowes G. Photosynthetic and other phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative $C(4)$ system of *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol.* 2002, 130(2): 876-886
- [18] Magnin N C, Cooley B A, Reiskind J B, Bowes G. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol.* 1997, 115: 1 681-1 689
- [19] Voznesenskaya E V, Franceschi V R, Kíratz O, Artyusheva E G, Freitag H, Edwards G E. Proof of C_4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J.* 2002, 31: 649-662
- [20] Cushman J C, Meyer G, Michalowski C B, Schmitt J M, Bohnert H J. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell.* 1989, 1: 715-725
- [21] Fontaine V, Cabane M, Dizengremel P. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. *Physiol Plant.* 2003, 117(4): 445-452
- [22] Huo S-P (霍仕平), Yan Q-J (晏庆九), Song G-Y (宋光英), Xu M-L (许明陆). Progress in morphological and physiological and biochemical indexes of drought resistance. *Agricultural Research in the Arid Areas (干旱地区农业研究)*, 1995, 13(3): 67-73
- [23] Jeanneau M, Gerentes D, Fouelllassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C_4 -PEPC. *Biochimie.* 2002, 84(11): 1 127-1 135
- [24] Naidu S L, Moose S P, AL-Shoaibi A K, Raines C A, Long S P. Cold tolerance of C_4 photosynthesis in *Miscanthus* × *Giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C_4 photosynthetic enzymes. *Plant Physiol.* 2003, 132(3): 1 688-1 697
- [25] Kubien D S, von Caemmerer S, Furbank R T, Sage R F. C_4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of Rubisco. *Plant Physiol.* 2003, 132(3): 1 577-1 585
- [26] Gonzalez M C, Sanchez R, Cejudo F J. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta.* 2003, 216(6): 985-992